

- イルス学会学術集会（大阪）2012年11月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋 仁、許斐奈美、相内 章、長谷川秀樹、田代真人：細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
 - 3) 川口 晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
 - 4) 池田千将、伊藤 良、相内 章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
 - 5) 泉地恭輔、相内 章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹：経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
 - 6) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、伊藤 良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
 - 7) 相内 章、池田千将、伊藤 良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
 - 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
 - 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
 - 10) 浅沼秀樹、相内 章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人：野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
 - 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内 章、藤本 陽、千葉 丈：インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第16回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得（出願）
なし
 2. 実用新案登録
なし

HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所 エイズ研究センター長

研究要旨 HTLV-1 感染症は ATL（成人 T 細胞白血病）等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題である。本研究では、HTLV-1 感染細胞を標的とする有効な細胞性免疫反応の誘導法開発を目的とし、標的抗原候補として最重要と考えられる Tax 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応の解析を進めることとした。平成 24 年度は、Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植したマウスにおける Tax 特異的 CTL 反応誘導を示す結果を得た。本研究結果をもとに平成 26 年度はこの系を発展させ、Tax 特異的 CTL 誘導効果を検討する計画である。

A. 研究目的

本邦の HTLV-1 感染者数は 100 万人以上と推定されている。HTLV-1 感染症は ATL（成人 T 細胞白血病）あるいは HAM（HTLV-1 関連脊髄症）等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題である。近年の母乳による感染予防対策だけでは不十分であることも指摘されており、HTLV-1 感染症克服に向け、ワクチン開発は重要な戦略である。

本研究では、HTLV-1 抗原発現細胞に対する有効な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を増強するワクチン開発を目指すこととした。HTLV-1 は感染細胞の伝播により感染が拡大することから、感染細胞発現抗原を標的とする免疫誘導は感染防御に結びつくことが期待される一方、免疫増強による HTLV-1 感染細胞の排除は、ATL 発症防御に結びつくことも期待される。

我々はこれまでセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いたワクチンシステムを開発し、その優れた CTL 誘導能を明らかにしてきた。このデリバリーシステムを HTLV-1 感染症に

対するワクチンとして応用するためには、まずどのような抗原を標的とする CTL 反応を誘導すべきかを検討する必要がある。

HTLV-1 は潜伏感染を呈し、感染細胞においてウイルス抗原の多くはその発現が抑制されている。したがって、CTL が認識しうる標的抗原も限られていると考えられ、どの標的抗原特異的 CTL 反応の誘導が HTLV-1 感染細胞の排除あるいは ATL 発症につながるかをすることは重要である。これまでの文献等をもとに、本研究では、標的抗原候補として最重要と考えられる HTLV-1 Tax を標的とする CTL 反応を中心とした解析を進めることとした。平成 24 年度は、Tax トランスジェニックマウス由来の mATL 細胞を移植した同系マウスにおける Tax 特異的 CTL 反応を解析した。

B. 研究方法

本研究事業の研究代表者が開発した独自の ATL 発症モデルである Tax トランスジェニックマウス (Nat Med 12:466, 2006) 由来の mATL 細胞を利用することとした。研究代表者との

共同実験で、mATL 細胞 1×10^6 を、同系の正常 B6 マウスの腹腔に移植した。移植後 1 週目、2 週目、3 週目の脾臓（各 1 頭）および非移植マウスの脾臓を採取し、リンパ球を分離して、Tax オーバーラッピングペプチドプール刺激後の特異的インターフェロン γ (IFN- γ) 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、Tax 特異的 CTL 反応を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査・承認後に開始した。

C. 研究結果

対照マウスでは、Tax 特異的 CTL 反応は認められなかったが、mATL 移植後 3 週目の解析では、いくつかの Tax ペプチドプール刺激による CTL 反応を認めた。特に Tax46-100 特異的および Tax301-353 特異的 CTL 反応が認められた (図 1)。移植後 1 週目・2 週目の解析でも、ボーダーラインの反応が認められた。

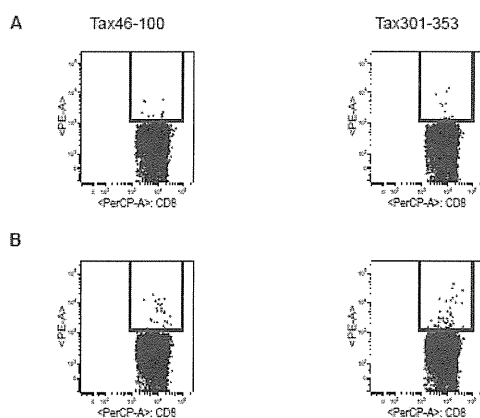


図 1. HTLV Tax 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応
B6 マウスに Tax トランスジェニックマウス ATL 細胞移植後 3 週目の脾臓より分離したリンパ球を用い、Tax オーバーラッピングペプチドプールによる刺激後の IFN- γ 誘導を細胞内免疫染色により検出することにより Tax 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応を測定した (下段: B)。上段 (A) は移植を行わなかった対照マウスの解析結果である。陽性と考えられる Tax46-100 特異的 (左) および Tax301-353 特異的 (右) 後の FACS 解析結果 (ドットプロット) を示す。

D. 考察

mATL 細胞の移植による Tax 特異的 CTL 反応の誘導が初めて示された。移植した mATL 細胞における Tax 発現は mRNA レベルでは確認されているものの蛋白レベルでは確認されていなかったが、本研究では mATL 細胞の移植により Tax 抗原特異的 CTL 反応が誘導されることが明らかとなった。今後は、この Tax 特異的 CTL 反応の抗 ATL 細胞増殖抑制効果を解析する計画である。特に、Tax 特異的 CTL 反応増強による ATL 細胞排除効果を期待している。

E. 結論

HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植したマウスにおける Tax 特異的 CTL 反応誘導を示す結果を得た。今後は、本研究結果をもとにこの系を発展させ、Tax 特異的 CTL 誘導効果を検討する計画である。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14:1169-1176, 2012.
- 2) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.

2 学会発表

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/26/2012.

- 2) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、高原悠佑、松岡佐織、俣野哲朗. SIV 感染アカゲザルにおける各ウイルスタンパク抗原特異的 CTL 反応の網羅的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.

- 3) 俣野哲朗. エイズワクチン開発. ポスト日本ワクチン学会シンポ・サテライトシンポジウム、東京、11/19/2012.

- 4) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 反応誘導型治療ワクチン接種効果の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

HTLV-1 感染の克服に向けた病態の解明、感染・進展の防止、診断技術の 向上等に関する研究:HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発 —微量抗体検出法の開発と抗原エピトープの決定に向けた基盤研究—

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学 教授

研究協力者 松永 智子 横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)は、成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy:HAM) 等の重篤な疾患を発症する。しかしながら、現在のところ有効な治療薬やワクチンは開発されていない。また、HTLV-1 タンパク質は従来の手法では発現や可溶化が困難であったため、ワクチンのための抗原タンパク質の作製やモノクローナル抗体を作製することができなかった。我々は、昨年度に引き続き、HTLV-1 がコードするすべてのタンパク質を、生理活性を保持した状態で全長にて合成し、感染者および感染モデルマウス血清中の微量抗体の検出が可能なアッセイ系の構築を目指している。本年度は、HTLV-1 遺伝子をヒトコドンで最適化した人工 cDNA を鋳型として、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化標識された HTLV-1 全長タンパク質を合成し、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、AlphaScreen 法を用いた微量抗体検出法の開発を行った。

A: 研究目的

HTLV-1 感染症はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)の感染によっておこる感染症であり、感染者（キャリア）の中から成人T細胞白血病やリンパ腫（ATL）などの血液系の悪性疾患や HTLV-1 関連脊髄症(HTLV-1 associated myelopathy:HAM)等の重篤な神経疾患が引き起こされる。特に乳幼児における母乳からの感染や、年長者や老人における上記疾患の発症予防法の開発に向けた基礎研究を進めることは重要である。HTLV-1 感染者は日本南西部に集中していたが、現在では大都市でも増

加しており全国への拡散傾向がみられている。HTLV-1 の感染経路には、母乳による母子感染、性交渉及び血液を介した水平感染が考えられている。HTLV-1 による細胞発がん機構については研究が進んでいるが、HTLV-1 感染の防御や、ATL の発症を予防するワクチンや効果的な治療薬は開発されていない。

今回、我々は、HTLV-1 ワクチンの開発や患者血清中の微量抗体の測定に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて HTLV-1 全長タンパク質の合成を行った。また、AlphaScreen 法を活用することで、血清中の微量抗体の検出法を新たに開発した。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 ATK-1 (HTLV1A) がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27L, p30II) について、ヒトコドンに最適化した人工遺伝子を合成した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、コムギ無細胞タンパク質合成系の発現ベクターである pEU-E01-bls-S1 にサブクローニングした (bls: biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS)。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型に、SPu primer および AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、コムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞タンパク質合成系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を加えることにより行った。

2. HTLV-1 全長タンパク質の発現確認および定量

合成されたタンパク質は、Western Blotting により Streptavidin-HRP を用いて検出した。タンパク質の可溶化は、タンパク質合成液を 15000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min で遠心し、その上清を回収、泳動することで確認した。可溶化が困難であった Gag, TAX-1, HBZ タンパク質に関して、塩化亜鉛や界面活性剤 Brij35 をタンパク質合成中に加え、タンパク質の可溶化条件を検討した。

タンパク質の定量は、作製した SDS-PAGE にアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS (Wako, 178-00551) で染色した。ゲルはルミノ・イメージ・アナライザー LAS-3000 (FULIFILM) でスキャンし、汎用解析ソフト Multi Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

3. 化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、AlphaScreen 法を用いた微量抗体検出法の開発

まず基質として用いる HTLV-1 全長タンパク質の N 末端にビオチン化配列を付加して無細胞合成し、患者血清と混合後、AlphaScreen 検出用ビーズを加えることで、抗原タンパク質の N 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合し、抗原に結合した特異抗体にプロテイン G がコートされたアクセプタービーズが結合する。これら 2 つのビーズが近接した複合体を形成させた後、680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルとして検出される。特異的抗体が存在しない場合は、ビーズ同士が近接できないためシグナルが検出されないというアイデアに基づいている。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒトおよび動物検体を使用した実験は実施していないが、今後の臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者（感染者）の同意を得た上で行う予定である。

C. 研究結果

1. コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 タンパク質の合成を効率化するために、ヒトコドンに最適化した人工 HTLV-1 遺伝子を合成した。次に真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムを用いて、リコンビナ

ント HTLV-1 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-bls-S1 ベクターに各遺伝子を導入し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチンが付加された HTLV-1 タンパク質の合成を行った。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型に PCR 法により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、コムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞タンパク質合成系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を添加した。合成したビオチン化タンパク質を遠心分離後、SDS-PAGE で泳動し、Streptavidin-HRP を用いて検出を行った。その結果、7種類の全ての全長タンパク質の合成が確認された。収量としては1~2マイクログラム/150マイクロリットルと、通常のタンパク質とほぼ同様の合成効率を確保できた。また、ビオチン化効率も50%以上の合成タンパク質で認められ、今後のアッセイ系の構築に本法が活用できることが確認された。

2. HTLV-1 全長タンパク質の可溶化の検討

次にタンパク質の可溶化を検討するため、ビオチン化全長タンパク質を、ストレプトアビジンセファロースビーズによるカラム法を用いて簡易精製した。次に可溶化および非可溶化分画を回収し、Western Blotting を行った。その結果、Gag、HBZ および Tax タンパク質の可溶性がきわめて低いことが判明した。そこで、合成したタンパク質に塩化亜鉛および界面活性剤である Brij35 を各濃度で添加し、可溶化を試みた。その結果、Gag は 1 μ M の塩化亜鉛および 0.05% の Brij35 の添加、Tax は 1 μ M の塩化亜鉛の添加、HBZ は 0.05% の Brij35 の添加により顕著に可溶性が亢進することが判明した。特に HBZ の可溶化率は 40~50%程度に上昇した。上記の検討により可溶化できた HBZ リコンビナントタンパク質を用いて、モノクローナル抗体の作製を試み

た結果、抗原特異的なモノクローナル抗体の作製に至った。また、Tax リコンビナントタンパク質をリポソーム内に封入することに成功した。本標品を新たな HTLV-1 ワクチンの抗原として活用する予定である。

3. AlphaScreen を用いた血清中の抗 HTLV-1 抗体測定法の開発

上記の手法で合成された、N末がビオチン化された HTLV-1 タンパク質に特異的抗体または血清を添加後、AlphaScreen 試薬 (スロレプトアビジンコートアクセプタービーズ、プロテイン A コートドナービーズ) を付加し 60分、26 $^{\circ}$ C でインキュベート後、AlphaScreen 検出器 (EnvisionTM, パーキンエルマー社) で検出を行った。予備実験として市販の抗 HTLV-1 抗体を段階希釈し抗体の検出を行った。上記で合成した HTLV-1 タンパク質と抗体を混ぜ合わせ、AlphaScreen 法を用いて HTLV-1 タンパク質に対する特異的抗体の有無およびエピトープを検出した。その結果、Env 抗体、Gag 抗体について、容量依存的に抗体価を簡便に測定することができた。今後はアッセイ条件を検討することで、特異性および感度を高めるとともに、各種血清検体においても定量可能となるように条件検討を行う。

D. 考 察

我々は、コムギ無細胞タンパク質合成系を活用し、全長 HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。本研究の特色としては、これまでの研究ではタンパク質の可溶化が困難であった HTLV-1 ウイルスタンパク質の合成・可溶化を簡便に行うことができると及び AlphaScreen 法を用いたハイスループットな抗体検出系を確立する点である。ウイルス研究における課題の一つに、可溶化ウイルスタンパク質の合成がある。HTLV-1 ウイルスタンパク質においても、大腸菌や生細胞を用いた合成ではタンパク質の凝集が起こるため、そ

の後の解析に使用することが困難であった。本研究では、翻訳合成液内に界面活性剤を加えることで容易に可溶化タンパク質を合成できるコムギ無細胞タンパク質合成系を用いることによりウイルスタンパク質の可溶化を試みる。タンパク質の可溶化が可能となれば、ウイルスタンパク質の大量合成、精製により様々な研究への応用が示唆される。また、感染阻止、発症阻止の為のワクチン開発にはそれぞれの対象疾患に適した抗原の検討が必要である。本研究では、AlphaScreen 法を用いた抗体検出系の確立を行い、可溶化ウイルスタンパク質と感染患者検体やモデルマウス血清に含まれる抗 HTLV-1 抗体の有無を調べる。これらのアッセイの結果により、HTLV-1 感染による様々な疾患に特異的な抗ウイルス抗体のプロファイリングが進み、ワクチン候補タンパク質の探索や同定した抗体による感染阻害効果などワクチン開発に繋がると考えられる。

E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成系を活用し、HTLV-1 抗原タンパク質を作製した。またそれらを活用し、HTLV-1 タンパク質に対する抗体の測定法を開発した。今後は様々な臨床段階の患者血清中の抗 HTLV-1 抗体を測定するとともに、その抗原エピトープを特定することで、新たなワクチン開発のための基礎データとする予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the

viral protein Vpu. *Sci Signal*. 245(5): ra73, 2012.

- 2) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics*. 75(15): 4863-73, 2012.
 - 3) Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun*. 425(2): 284-9, 2012.
 - 4) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol*. 87(4):2120-27, 2012.
- ### 2. 学会発表等
- 1) 工藤あゆみ、高濱正吉、澤崎達也、梁 明秀 : Atypical protein kinase C による HIV-1 Gag Ser487 のリン酸化はウイルス感染性を増強する. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪.
 - 2) 松永智子、泉地恭輔、松尾 泉、塚越博之、木村博一、梁 明秀 : ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型全長 HN タンパク質を封入した経鼻投与型リポソームワクチンの開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪.
 - 3) 工藤あゆみ、宮川 敬、松永智子、森下 了、

早川 智、梁 明秀：HIV アクセサリー蛋白質 Vpx と相互作用する宿主因子の網羅的探索と機能解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-16 日 (土-月)、神奈川.

4) 宮川 敬、森下 了、道場生基、松永智子、工藤あゆみ、高折晃史、梁 明秀：HIV-1 Vif-APOBEC3G の相互作用を調節する新規宿主因子の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-16 日 (土-月)、神奈川.

5) 佐藤 遥、宮川 敬、工藤あゆみ、梁 明秀：HIV-1 Vpu の翻訳後修飾とその意義. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-16 日 (土-月)、神奈川.

G. 知的所有権の出願・登録状況等

該当なし

ワクチン応答性に影響を及ぼす免疫反応の解析

研究分担者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)やHTLV-1関連脊髄症(HTLV-1 associated myelopathy:HAM)等のHTLV-1関連疾患は、HTLV-1感染者(キャリア)に50年近い潜伏期を経て発症する重篤な疾患であり、感染予防や発症予防を目的とした有効なワクチン開発が望まれている。発症予防ワクチンの接種対象者には、成年期以降のキャリアが多く含まれるが、小児と成人や老年者ではワクチン効果に相違が見られることがしばしば遭遇され、HTLV-1関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効なウイルス抗原の網羅的解析が必要となる。

本年度はワクチン応答性に関わる免疫応答の変化に関して、プロテアソーム機能に着目した検討を進めた。プロテアソーム機能は細胞増殖やTh1/Th2分化の制御、サイトカイン産生等に関与しており、加齢により機能が低下することが報告されている。プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス(老化マウスモデル、 β 5t-Tg)から分離した脾細胞を用い、MLR反応を検討したところ、 β 5t-Tg由来脾細胞ではMLR反応が減弱していた。また、マルチプレックスサスペンションアレイによる検討を行ったところ、IL-2やIFN- γ など、Th1系のサイトカイン産生、ケモカインの一部が低下していることが明らかになった。今後は本老化マウスモデルを用い、ワクチン効果の影響を明らかにする予定である。

A. 研究目的

HTLV-Iの感染予防および発症予防ワクチンを開発することを目的とする。有効なワクチンが開発されることで、感染者の減少、有効な治療法が未だ確立されていないHTLV-I関連疾患の発症予防が期待される。

B. 研究方法

1. マウス

β 5t-Tgの作製には、発現プロモーターpCAGGS(CMV-IE, chicken β -actin, rabbit β -globin)を用い、C57BL/6N(B6)をバックグラウンドとして、マウス β 5t cDNAを全身発現するトランスジェニックマウスの作製を

オリエンタル酵母(株)に委託した。実験には雄性 β 5t-Tgと雌性B6野生型(wild type; WT)マウスを交配したF1マウスを用いた。コントロールマウスはB6 WTマウスを、MLR反応にはBALB/cマウスを三共ラボより購入した。

2. 細胞分離とMLR反応

β 5t-TgおよびWTマウスを犠牲死させ、脾臓を摘出し、セルスクレーパー(BD Falcon)と100 μ mのセルストレイナー(BD Falcon)を用いて細胞を分離し、PBSに浮遊させた。マイトマイシンC処理を行ったBALB/c脾細胞をstimulatorとしてMLR反応を行い、細胞増殖率を検討した。

3. サイトカイン、ケモカイン測定

MLR 反応を行った well 中の培養液を用い、マルチプレックスサスペンションアレイを用いて、各種サイトカイン、ケモカイン量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. MLR 反応の解析

β 5t-Tg 由来脾細胞ではコントロール WT 由来脾細胞に比べ、MLR 反応が低下していた。また、老齢 WT でも若齢マウスに比して MLR 反応が低下していた (図 1)。

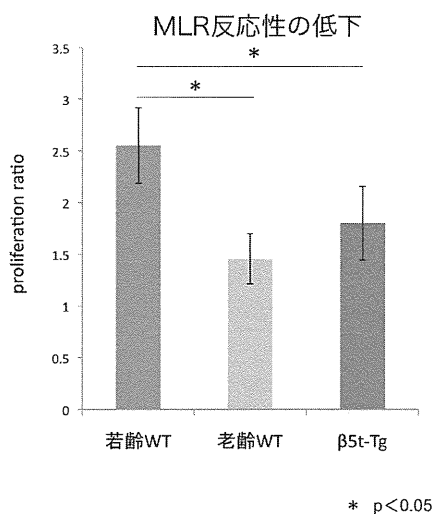


図 1 プロテアソーム機能低下と MLR 反応の変化

2. サイトカインケモカインの発現

β 5t-Tg 由来脾細胞では T 細胞刺激時に IL-2 や IFN- γ など、Th1 系のサイトカイン産生が低下していることが明らかになった。また、ケモカインの産生低下を認めた (図 2)。

D. 考察

免疫応答の加齢による変化に関して、プロ

テアソームの機能異常という着眼点に基づき、基礎的な検討を行った。その結果、プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス (老化マウスモデル、 β 5t-Tg) では MLR 反応の低下やサイトカインやケモカイン産生の低下を認め、いわゆる免疫老化に類似した異常を呈している可能性が示された。

E. 結論

β 5t-Tg マウスはプロテアソームの機能異常による免疫応答の変化を解析できる有用なモデルであると考えられる。今後は、本老化マウスモデルを用い、ワクチン効果の影響を明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Tomaru U](#), Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* 180(3):963-72, 2012
- 2) Nakazawa D, [Tomaru U](#), Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol* 3:333. doi: 10.3389/fimmu.2012.00333, 2012
- 3) Katsurada T, Kobayashi W, [Tomaru U](#), Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 7(9):e44113, 2012

4) Baba T, Badr Mel S, Tomaru U, Ishizu A, Mukaida N. Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirp α + dendritic cells: a murine model. PLoS One 7(7):e41154, 2012

5) Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired degradation of

propylthiouracil- induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Arthritis Rheum 64(11):3779-87, 2012

6) Tomaru U, Yamada Y, Ishizu A, Kuroda T, Matsuno Y, Kasahara M. Proteasome subunit $\beta 5t$ expression in cervical ectopic thymoma. J Clin Pathol 65(9):858-9, 2012

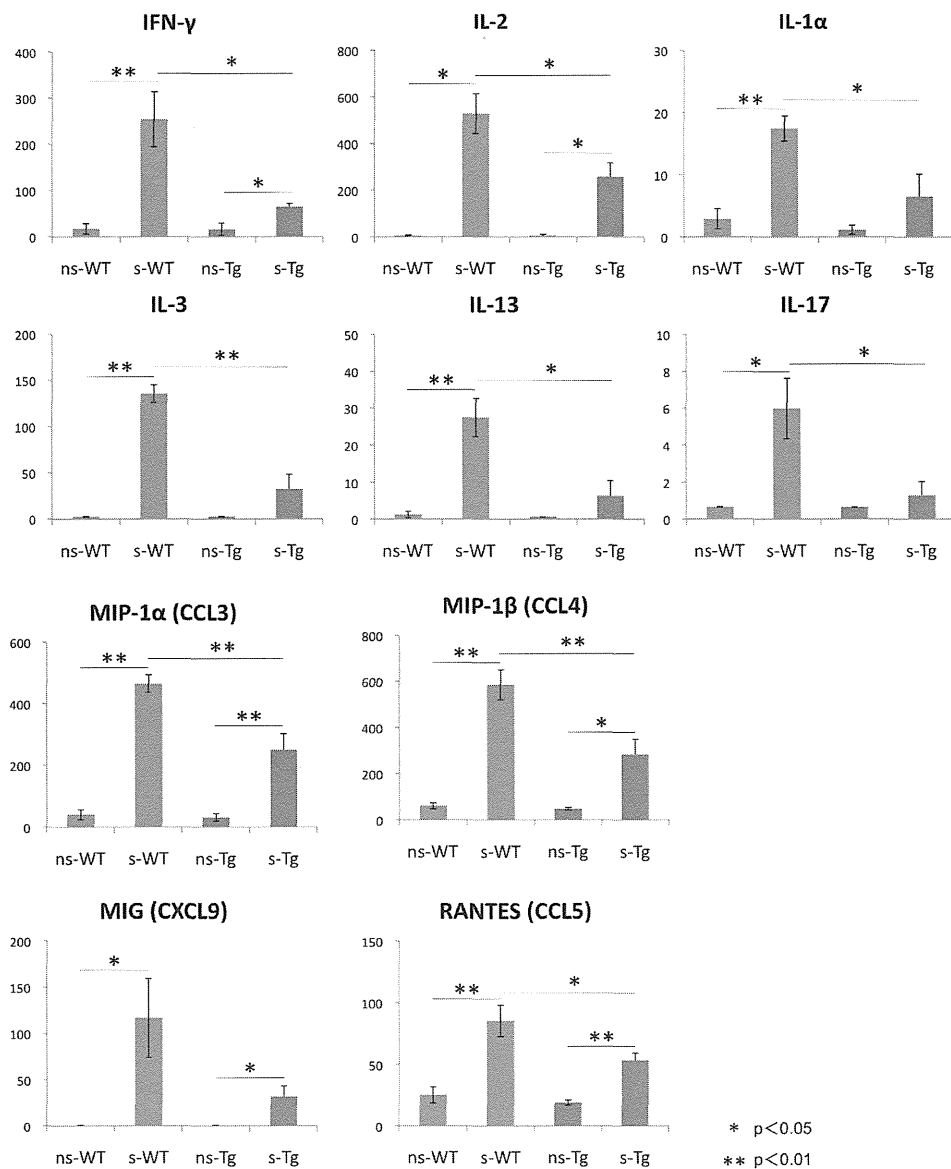


図2 プロテアソーム機能低下とサイトカイン、ケモカインの変化

- 7) Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest* 93(1):72-80, 2013
- 8) Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* (in press), 2013
2. 学会発表
- 1) 山田洋介、外丸詩野、木内隆之、石津明洋、松野吉宏、笠原正典：プロテアソーム機能の低下と COPD に対する病理作用 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 2) 小野綾子、外丸詩野、石津明洋、小原次郎、紺野沙織、笠原正典：プロテアソーム活性の低下が腫瘍微小環境に与える影響 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 3) 宮武由甲子、外丸詩野、Noreen Sheehy、石津明洋、William W. Hall、笠原正典：成人 T 細胞白血病 (ATL) の病態における上皮細胞の役割の検討 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 4) 松井由希、深谷進司、外丸詩野、渥美達也、笠原正典、石津明洋：TNF α 変換酵素 (TACE) の過剰発現が糖および脂質代謝へ及ぼす影響 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 5) 小原次郎、外丸詩野、鈴木小百合、紺野沙織、村田茂穂、田中啓二、石津明洋、笠原正典：胸腺プロテアソームの発現異常が T 細胞分化に与える影響について 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 6) 今本鉄平、大塚紀幸、山田洋介、外丸詩野、高階太一、石津明洋、笠原正典：肺腺癌に伴うトルソー症候群により肺高血圧症を合併した一剖検例 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 7) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常とその病理作用 第 92 回北海道医学大会病理分科会・第 45 回北海道病理談話会、札幌、2012
- 8) Ohara J, Tomaru U, Ishizu A, Konno S, Suzuki S, Murata S, Tanaka K, Kasahara M : Skewed T cell development in mice with aberrant expression of thymoproteasome. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012
- 9) Nakazawa D, Tomaru U, Nishio S, Atsumi T, Kasahara M, Ishizu A : Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil (PTU): Implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis (MPO-AAV). 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012
- 10) Miyatake Y, Tomaru U, William W. Hall, Kasahara M : Contact with epithelial cells induces cancer stem cell-like properties in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける ATL 様病態と抗 HTLV-1 免疫

研究分担者 田中 正和 関西医科大学微生物学講座 助教

研究要旨 HTLV-1 感染予防ワクチンおよび ATL 発症予防ワクチンの開発に向け、我々は HTLV-1 感染個体の病態およびヒト免疫系を再現するマウスモデルの開発を進めている。ヒト化マウス腹腔内へ HTLV-1 感染細胞を接種した場合、HTLV-1 感染ヒト T 細胞の急激な腫瘍性増殖の結果、短期間で宿主免疫系が破綻する。そこで、感染細胞と宿主免疫との間に平衡関係が維持される未発症感染者（ウイルスキャリア）の状態を再現する目的で、感染細胞の経口投与による感染を試みたところ、低レベルでの感染が持続した。その際、HTLV-1 特異的ヒト抗体およびサイトカインの発現等、抗 HTLV-1 宿主免疫も持続することが確認された。以上の結果から、経口感染を介した HTLV-1 感染ヒト化マウスは、ヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチン開発における動物モデルとして有用であることが示された。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL)や HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の原因となるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)の感染者は本邦に 100 万人以上存在するが、有効な治療法は未だ確立されていない。従って ATL 治療法のみならず、感染予防および発症予防への取り組みは重要な課題点である。

我々は抗 HTLV-1 感染細胞ワクチンの開発を目的とし、ヒト免疫系を個体内に再構築したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで、抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導と平行して、感染細胞クローンの選択的増殖による ATL 様病態が再現されることを昨年度報告した。

ところが、同感染マウスにおいては、感染細胞の急激な腫瘍増殖の結果、抗 HTLV-1 宿主免疫は最終的に崩壊に至ることから、発症予防ワクチンの開発においては、より未発症感染者(ウイルスキャリア)に近い感染モデル

の作出が求められた。そこで本年度は、低レベルでの持続感染状態を維持する感染マウスを作製することを目的に、ヒトにおける主要な感染経路である経口による感染を試み、さらに同感染マウスにおける宿主免疫応答を検討した。

B. 研究方法

1. HTLV-1 の感染

ヒト化マウスは、 γ 線全身照射(5Gy)処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨骨髓内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 (5×10^4 個)を注入・移植し作製した。末梢血中にヒト T 細胞が確認された段階のヒト化マウス(骨髓移植 4 ヶ月後)に、腹腔内あるいは経口で、放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染細胞を、それぞれ 2.5×10^6 個あるいは 1.0×10^7 個投与し感染を成

立させた。

細胞接種後、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数の計測を定量的 PCR 法にて経時的に計測した。感染ヒト化マウスは体重の減少を指標に供死し、脾臓および各種浸潤臓器における感染細胞の解析を行った。

2. HTLV-1 感染 Jurkat 細胞(JEX)の作製

HTLV-1 感染性クローンプラスミド DNA(pX1 MT-M)を 293T 細胞に一過的に細胞導入し HTLV-1 を産生させた後、予め赤色蛍光蛋白 TOMATO を Tax 応答配列制御下に発現する Jurkat 細胞、JUL、と 24 時間共培養し、TOMATO を強発現する JUL 細胞を FACS にて分離した。得られた TOMATO 強発現 JUL 細胞群を更に段階希釈法にてクローニングし、細胞株を樹立した (JEX 細胞株)。

3. 感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA をカラム法 (PureLink Genomic DNA Mini Kit: Invitrogen) にて精製し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的とした TaMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。また同時に内部標準として human β -globin 遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

4. HTLV-1 抗体価

HTLV-1 抗体価は、ゼラチン凝集(PA)法 (富士レビオ) を用いて測定した。

5. サイトカイン測定

HTLV-1 感染ヒト化マウス血清中のヒトサイトカイン・ケモカイン (IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、CCL4/MIP-1 β) の濃度は、multiplex beads-based assay

(Bio-Plex Human Cytokine 8-plex Assay Beads Assay)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は京阪さい帯血バンクにおいて、提供者の同意の下に採取されたもののうち、移植に用いられないロットを研究内容および倫理項目を審査、許可後に、研究用として提供され使用している。

また動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を提出し、審査の後承認されている。

C. 研究結果

1. HTLV-1 感染源の検討

これまで我々は、ヒト化マウスの HTLV-1 感染に、感染性の高いことが報告されている MT-2 細胞株を用いてきた。しかし昨年度、HTLV-1 感染ヒト化マウス内の感染 T 細胞内のプロウイルスを解析したところ、白血球状態を呈する感染後期においては、プロウイルスのほとんど全てが完全長 HTLV-1 で占められているのに対して、感染初期(2~4 週)では、欠損型プロウイルスが半数以上の細胞で観察された。そこで、MT-2 細胞株から産生されるウイルスに含まれる HTLV-1 ゲノムを解析したところ、そのほとんどが欠損型であることが明らかとなった。同欠損型プロウイルスは、Tax 等の pX 遺伝子産物を産生しなかったが、HBZ の発現が予想されたため、よりヒトの感染系に近い状況を再現するため、完全長ウイルスのみを産生する感染細胞株の樹立を試みた。

そこで、HTLV-1 感染性クローンプラスミド DNA を用いて産生されたウイルスを感染させた Jurkat 細胞株、JEX、を樹立し (研究方法の項参照)、これを感染源としてヒト化マ

ウス腹腔内に投与したところ、MT-2 細胞を用いた場合と同等の感染形態を示すことが明らかとなった。また、感染細胞内のプロウイルスを解析したところ、感染初期から完全長ウイルスの感染が確認された。従って、以後の感染実験には JEX 細胞を用いることとした。

2. 経口感染による病態変化

感染細胞株のヒト化マウス腹腔内投与による感染においては、ATL 様の病態が再現されるものの、感染細胞の急激な腫瘍増殖の結果、抗 HTLV-1 宿主免疫は早期に破綻し、感染数ヶ月以内に感染個体は白血病死に至る。そこで、感染細胞と宿主免疫の平衡関係が維持されるウイルスキャリアと同等の感染状態を確立するため、ヒトにおける主要な感染経路である経口による感染を試みた。

1.0×10^7 の JEX 細胞をヒト化マウスに経口投与したところ、末梢血中の CD3 陽性ヒト T 細胞数、T 細胞における CD25 陽性画分の割合はいずれも、対象群と比べて差は認められなかったものの、投与 3 週目前後から、有意な量のウイルス感染が観察され、90%以上の個体が 20 週以上生存した。末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量は、末梢血中 100 個において 1 コピー程度であった。また、血清中の抗 HTLV-1 抗体価を測定したところ、感染 3 週より継続的な抗体の産生が観察された。さらに感染 17 週の血漿中のヒトサイトカインの発現を計測したところ、IFN- γ の産生が対照群と比べ有意に増大しており、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 についても増加傾向が確認された。

3. 抗 CD8 抗体投与による感染細胞数の一過的増加

そこで感染細胞株の経口投与による感染で樹立した HTLV-1 感染ヒト化マウスにおけ

る低感染状態の維持における、抗 HTLV-1 宿主免疫の関与を明らかにする為、抗ヒト CD8 抗体の腹腔内投与による細胞障害性 T 細胞の血中からの枯渇・除去を試みた。抗ヒト CD8 IgG を隔日で 3 回経口感染ヒト化マウス腹腔内に投与したところ、投与 1 週目においてヒト CD8 T 細胞の完全な除去が観察され、この状態は数週間以上維持された。この間における末梢血ヒト T 細胞中のプロウイルス量を測定したところ、投与前平均 0.2%前後であった感染率が、投与 1 週後に、平均 1.2%にまで上昇した。抗体投与 3 週目には、感染細胞の数は平均 0.4%程度にまで減少し、その後も維持された。抗体投与 1 週後の各感染個体での感染率の上昇は、5-30 倍に達し、持続感染状態を示す経口感染ヒト化マウス体内での感染細胞の制御における CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の関与が強く示唆された。

D. 考察

腹腔内投与によるこれまでの HTLV-1 感染ヒト化マウスは、感染 CD25 陽性 CD4 T 細胞の異常増殖に加え、ATL に特徴的である花弁様分葉核を持った T リンパ球の出現を見たことから、ATL の病態の多くを再現していると考えられる反面、急性の病態変化を伴うため宿主免疫の制御が困難であった。しかし今回、ウイルス発現細胞を経口投与し感染を成立させることにより未発症感染者（ウイルスキャリア）と同等な持続感染モデルを確立することができた。このモデル系においては、低いウイルス量の維持とともに、有意な量の抗 HTLV-1 抗体やサイトカインの発現等、抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導が確認され、更に抗 CD8 抗体投与による細胞障害性 T 枯渇実験では、一過的な感染細胞数の増加が観察されたことから、感染細胞と宿主免疫との平衡関係

が成立している可能性が強く示唆された。

E. 結論

本実験の成果より、HTLV-1 感染細胞の経口投与によるヒト化マウス感染系において、ヒト未発症感染者（ウイルスキャリア）と同等な持続感染モデルを確立することに成功した。同マウスにおいては、感染細胞と宿主免疫との平衡関係が成立している可能性が強く示唆されることから、ATL 発症予防ワクチン開発を進める上で重要な実験基盤を提供すると考える。今後は、末梢血におけるウイルス感染率を指標に、DNA ワクチンやペプチドワクチン等の評価をおこなっていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda M, Tanaka M, Mushiake M, Takahashi J, Tanaka K, Watase J, Fujisawa JI, Miwa M. A novel pathway of centrosome amplification that does not require DNA lesions. *Cancer. Sci.* 103: 191-196.2012.

2. 学会発表

1) 第 31 回分子病理学研究会 恵那シンポジウム、2012 年 7 月 21 日～22 日（岐阜）、田中正和、和田直樹、橋本岩男、津田洋行、藤澤順一、三輪正直 HTLV-1 の Tax 発現リンパ腫細胞のウシラクトフェリンによる腫瘍抑制効果の検討

2) 第 31 回分子病理学研究会 恵那シンポジウム、2012 年 7 月 21 日～22 日（岐阜）、塚田匡輝、田中正和、寺田佳優、園田俊郎、三輪正直、藤澤順一 緑茶カテキンによる HTLV-1 感染細胞増殖抑制効果の検討

3) 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9

月 19 日～21 日（札幌）、田中正和、高橋淳、江口貴之、虫明正敏、藤澤順一、三輪正直 CHO-K1 細胞におけるポリ ADP リボシル化抑制による細胞増殖効果について

4) 第 5 回日本ラクトフェリン学会学術集会、2012 年 10 月 27 日（東京）、和田直樹、田中正和、橋本岩男、津田洋行、藤澤順一、三輪正直 HTLV-1 の Tax 発現リンパ腫細胞のウシラクトフェリンによる腫瘍増殖抑制効果の検討

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T.	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam.	Mod Pathol	26(3) Epub 2012 Nov 23	357-369	2013
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T.	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood	120(24) Epub 2012 Oct 11	4733-4743	2012
van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H.	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine	30(40) Epub 2012 Jul 24	5893-5900	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Virol	84(2)	336-344	2012
Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T	Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques	Microbes Infect	14	1169-1176	2012

Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T	A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8 ⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques	PLoS ONE	8	e54300	2013
Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A.	Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis.	Clin Exp Nephrol	2012 Dec 6	[Epub ahead of print]	2012
Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A.	Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation.	Lab Invest	93(1)	72-80	2013
Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A.	Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis.	Front Immunol	3:333	doi: 10.3389/fimmu.2012.00333	2012
Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M.	Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis.	PLoS One	7(9)	e44113	2012
Baba T, Badr Mel S, Tomaru U, Ishizu A, Mukaida N.	Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirp α ⁺ dendritic cells: a murine model.	PLoS One	7(7)	e41154	2012